



(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 35 125 T2** 2008.02.07

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 231 837 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 35 125.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/32261**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 980 766.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/037656**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.11.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **31.05.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.08.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **06.06.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.02.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A01N 1/02*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
166928 P **22.11.1999** **US**

(73) Patentinhaber:
Avant Immunotherapeutics, Inc., Needham, Mass., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(72) Erfinder:
BRONSHTEIN, Victor, San Diego, CA 92130, US;
LINKOWSKI, Lynn, San Diego, CA 92102, US

(54) Bezeichnung: **KONSERVIERUNG VON EMPFINDLICHEM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Formulierungen und Verfahren zur Konservierung von empfindlichen biologischen Stoffen, die aus Lebendvakzinen ausgewählt sind, die Viren, Bakterien oder Parasiten umfassen, durch Trocknen. Genauer gesagt betrifft die vorliegende Erfindung Konservierungsgemische, die das biologische Material und Schutzmittel umfassen, wobei die Gemische angepasst sind, um die Proben während der Dehydratisierung und der anschließenden Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen zu stabilisieren.

Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Empfindliche Biomoleküle, Viren, Bakterien, Vektoren, eukaryotische Zellen und kleine multizelluläre Individuen haben eine Vielzahl von Anwendungen, wie z.B. in pharmazeutischen Anwendungen für Human- und Veterinärmedizin, Immunisierungen und Vakzinen, Molekularbiologie, Gentherapie sowie in der Lebensmittelindustrie. Typischerweise sind diese bioaktiven Materialien, Viren und Zellen in wässriger Umgebung aktiv; demnach erfolgten herkömmliche Formulierungen solcher Proben in wässrigen Lösungen. Viele bioaktive Materialien, insbesondere Viren und Zellen, sind jedoch in wässrigen Lösungen empfindlich gegenüber Zersetzung und Verlust von Aktivität und/oder Lebensfähigkeit, insbesondere bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen. Dementsprechend ist es oft erforderlich, dass solche Proben gekühlt werden, oder sie weisen bei Raumtemperatur eine geringe Lagerfähigkeit auf.

[0003] Bioaktive Materialien, Viren und Zellen können durch eine Reihe von chemischen Mechanismen, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, zerstört werden. Wasser stellt bei fast allen diesen Zersetzungswegen einen Recktanten dar. Außerdem dient Wasser als Weichmacher, der die Entfaltung und Aggregation von Proteinen ermöglicht. Da Wasser an fast allen Zersetzungswegen beteiligt ist, stellt die Reduktion der wässrigen Lösung oder Suspension von bioaktiven Materialien, Viren und Zellen zu einem trockenen Pulver eine alternative Formulierungsmethodik dar, um die Stabilität solcher Proben zu steigern. Viren und Zellen können unter Einsatz von verschiedenen Verfahren, wie z.B. Gefriertrocknen, Trocknen durch Schaumbildung, Sprühtrocknen und Wasserentzug, getrocknet werden. Wässrige Lösungen von Biomolekülen, Viren und Zellen werden getrocknet und bis zu ihrem Einsatz als trockene Pulver gelagert.

[0004] Zusätzlich zu Dehydratisierung stellt Verglasung einen weiteren bedeutenden Ansatz zur Konservierung (Stabilisierung) von empfindlichen Biomolekülen, Viren und Zellen dar. Verglasung kann im trockenen Zustand bei Raumtemperatur sowie in einer wässrigen Umgebung unter Tieftemperaturbedingungen (Gefrieren) erfolgen. Stabilität bei Raumtemperatur in trockenem Zustand ist aus vielen Grünen höchst wünschenswert, wie z.B. einfache Lagerung und Wirtschaftlichkeit, Transport, Flexibilität der Zufuhrmöglichkeiten, Anwendbarkeit in Notfallsituationen und Zugänglichkeit für Staaten der Dritten Welt. In der Folge ist die Verglasung von Biomolekülen, Viren und Zellen in trockenem Zustand besonders wünschenswert. Das Trocknen von ungeschützten Biomolekülen, Viren und Zellen, wie z.B. das Frieren solcher Proben, kann jedoch sehr schädlich sein. Aus diesem Grund besteht Bedarf an der Entwicklung von Konservierungsgemischen, in denen Biomoleküle, Viren und Zellen dehydratisiert und verglast werden können, wobei sie nur ein Minimum ihrer Aktivität oder Lebensfähigkeit einbüßen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konservierungsgemisch, das ein biologisches Material, wie in Anspruch 1 definiert, das empfindlich für den Verlust von Aktivität oder Lebensfähigkeit während des Trocknens und der Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen ist, ein nicht-reduzierendes Derivat eines Monosaccharids, wie in Anspruch 2 definiert, und zumindest ein zusätzliches Schutzmittel umfasst, das aus der aus Saccharose, Trehalose, Polyvinylpyrrolidon und Proteinen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt eine Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 bereit.

[0007] Das Konservierungsgemisch weist eine Gesamtmasse der gelösten Stoffe auf. Bei einer Form umfasst das modifizierte, nicht-reduzierende Derivat eines Monosaccharids zwischen etwa 5 Gew.-% und 80 Gew.-% der Gesamtmasse der gelösten Stoffe. Noch bevorzugter umfasst das modifizierte, nicht-reduzierende Derivat

eines Monosaccharids zwischen etwa 20 Gew.-% und 60 Gew.-% der Gesamtmasse der gelösten Stoffe.

[0008] Das Konservierungsgemisch gemäß einer bevorzugten Form der vorliegenden Erfindung ist ein bestimmtes methyliertes Monosacharid, nämlich α-Methylglucose.

[0009] Wenn das Konservierungsgemisch ein nicht-reduzierendes Disaccharid umfasst, kann es sich um Saccharose oder Trehalose handeln. Das Protein, das Teil des Konservierungsgemischs ist, kann aus der aus Gelatine, Albumin, Molkealbumin oder Globulin bestehenden Gruppe und einem Stressprotein ausgewählt sein. In einer Ausführungsform kann es sich bei dem Protein um ein beliebiges Protein handeln, das in wässrigem Medium bei einer Temperatur von nicht mehr als etwa 50 °C und einem pH-Wert von mehr als etwa 9 oder weniger als etwa 5 stabil ist. Vorzugsweise beträgt die Proteinkonzentration mehr als etwa 3 Gew.-% und noch bevorzugter mehr als etwa 10 Gew.-%. Das polymere Schutzmittel, das gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird, kann aus der aus HES, PVP, Cyclodextrin und PEG bestehenden Gruppe ausgewählt werden.

[0010] Wenn MSG, nicht-reduzierende Disaccharide und/oder nicht-reduzierende Oligosaccharide Teil des Konservierungsgemischs sind, können diese zusätzlichen Schutzmittel zwischen etwa 5 Gew.-% und 80 Gew.-%, und noch bevorzugter zwischen etwa 20 Gew.-% und 60 Gew.-%, der Gesamtmasse der löslichen Stoffe umfassen. Wenn Oligosaccharide in dem Konservierungsgemisch eingesetzt werden, handelt es sich dabei gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vorzugsweise nicht um Raffinose.

[0011] Das Konservierungsgemisch ist vorzugsweise so formuliert, dass es während des Trocknens und der anschließenden Lagerung für zumindest zwei Wochen nicht kristallisiert. Bevorzugte Formulierungen umfassen Folgendes: Das Verhältnis von Saccharose zu (α- oder β-) Methylglucose beträgt etwa 4:1 bis etwa 1:2; und das Verhältnis von Saccharose zu MSG etwa 10:1 bis etwa 1:4.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Konservierung eines biologischen Materials, das in Bezug auf den Verlust von Aktivität oder Lebensfähigkeit während des Trocknens oder der Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen empfindlich ist.

[0013] Das offenbarte Verfahren kann für verschiedene Trocknungsprotokolle angewandt werden, wie z.B. Gefriertrocknen, Wasserentzug, Sprühtrocknen, Fließbetttrocknen, Trocknen in Vakuum, Trocknen in einer trockenen Atmosphäre und Trocknen durch Schaumbildung.

[0014] In einer Variation des offenbarten Verfahrens umfasst das Mischen weiters zumindest zwei Schritte, die das Beladen des Virus mit dem nicht-reduzierenden Monosaccharid-Derivat und das darauf folgende Zusetzen einer zusätzlichen Verbindung zur Bildung des Konservierungsgemischs umfassen. Das Beladen kann durch das Äquilibrieren des biologischen Materials in einer Lösung erfolgen, die das nicht-reduzierende Monosaccharid-Derivat umfasst.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0015] Fig. 1A zeigt die Wirkung von reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern auf die ICDH-Aktivität während der Lagerung bei Raumtemperatur.

[0016] Fig. 1B zeigt die Wirkung von reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern auf die ICDH-Aktivität während der Lagerung bei 37 °C.

[0017] Fig. 2 zeigt die Wirkung von reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern auf die ICDH-Aktivität während der Lagerung bei 50 °C.

[0018] Fig. 3 zeigt die Wirkung von nicht-reduzierenden Zuckern und Maltrin auf die ICDH-Aktivität während der Lagerung bei 50 °C.

[0019] Fig. 4 zeigt die Glastemperatur von methylierter Glucose.

[0020] Fig. 5 zeigt die Wirkung von Methyl-α-d-glucopyranosid auf die Konservierung von Streptococcus equi.

[0021] Fig. 6 zeigt die verlängerte Stabilität von dehydratisierter Luciferase in Perfluordecalin während der

Lagerung bei 37 °C.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform

A. Definitionen

[0022] Die Bezeichnung "chemische Stabilität" und/oder "Konservierung" bedeutet, wie hierin verwendet, dass die Zersetzung des biologischen Materials auf chemischen Wegen, wie z.B. durch Oxidation, Hydrolyse oder Enzymwirkung, ein annehmbares Maß nicht übersteigt. Anders ausgedrückt wird zumindest ein Maß an biologischer Aktivität oder Lebensfähigkeit beibehalten, das für die gewünschte kommerzielle Anwendung des Materials ausreicht. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Formulierung als konserviert erachtet, wenn zumindest 20 % der biologischen Aktivität oder Lebensfähigkeit bei der Rehydratisierung nach einer einwöchigen Lagerung bei 37 °C aufrechterhalten werden.

[0023] Die Bezeichnung "empfindliche biologische Materialien" umfasst Peptide, Polypeptide, Proteine, Enzyme und Co-Enzyme, Seren, Vitamine, Antikörper und Antikörperfragmente. Diese Bezeichnungen umfassen sowohl Gruppierungen natürlicher Abstammung als auch gereinigte oder mittels Rekombinationsverfahren hergestellte Gruppierungen. Diese Bezeichnung umfasst auch Lipoproteine und post-translational modifizierte Formen, z.B. glykosylierte Proteine. Analoga, Derivate, Agonisten, Antagonisten und pharmazeutisch annehmbare Salze von diesen sind ebenfalls durch diese Bezeichnung gedeckt. Ebenso umfasst die Bezeichnung modifizierte, derivatisierte oder nicht-natürlich vorkommende Peptide mit Aminosäuren in D- oder L-Konfiguration.

[0024] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die biologischen Materialien eine antigene Substanz, die in der Lage ist, eine Immunantwort hervorzurufen. Genauer gesagt kann es sich bei dem Antigen um ein Protein oder ein Proteinfragment, das auf der extrazellulären Domäne eines Tumors (z.B. zur Behandlung von Krebs) exprimiert wird, oder ein infektiöses Agens oder einen Teil davon handeln (z.B. Virus oder Bakterie). Die Bezeichnung "Vakzine" bezieht sich auf eine bestimmte Art der Immunisierung, wobei das bioaktive Material ein infektiöses Agens (oder ein Teil davon) ist, das einem Säugetier verabreicht wird, um eine Resistenz gegenüber der durch das Agens hervorgerufenen Infektionserkrankung herzustellen. Vakzinen können Viren, Bakterien und Parasiten, Virusteilchen und/oder einen beliebigen Teil eines Virus, eines infektiösen Agens oder eines Pathogens umfassen, wie z.B. Proteine und/oder Nucleinsäuren, die immunogen und deshalb zur Formulierung von Vakzinen nützlich sein können.

[0025] Der Ausdruck "Konservierung durch Schaumbildung" bezieht sich auf ein skalierbares Verfahren zum Trocknen von empfindlichen biologischen Materialien durch Sieden unter Vakuum unter Bedingungen, unter denen die biologischen Materialien ihre Aktivität oder Lebensfähigkeit über längere Zeiträume hinweg bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen beibehalten. Die spezifischen methodischen Beschränkungen, die durch "Konservierung durch Schaumbildung" zum Ausdruck kommen, werden untenstehend detailliert in zwei Teilen erläutert – (1) Erstes Schaumtrocknen und (2) Stabilitätstrocknen/Verglasen – und werden in US-Patent Nr. 5.766.520 an Bronshtein offenbart.

[0026] Die Bezeichnung "modifizierte nicht-reduzierende Monosaccharide" bezieht sich gemäß der vorliegenden Erfindung auf eine allgemeine Klasse von Zuckern. Bei den Modifikationen kann es sich um beliebige chemische Modifikationen handeln, wobei methylierte, ethylierte und chlorierte Derivate zu bevorzugen sind. Die Methyl-Derivate umfassen sowohl die α- als auch die β-Formen der Monosaccharide. In der Folge wird die Bezeichnung "(α- oder β-) Methylglucose" verwendet. In verschiedenen Beispielen wird ein bestimmtes modifiziertes nicht-reduzierendes Monosaccharid eingesetzt, nämlich Methyl-α-d-glucopyranosid; diese Verbindung wird durch MAG abgekürzt.

B. Konservierung von biologischen Materialien

[0027] Das Dehydratisieren von biologischen Proben bei erhöhten Temperaturen kann sehr schädlich sein, insbesondere wenn die angewandte Temperatur für das Trocknen beispielsweise höher ist als die entsprechende Proteindenaturierungstemperatur. Um die Proben von Schädigungen in Zusammenhang mit erhöhten Temperaturen zu schützen, kann das Dehydratisierungsverfahren schrittweise oder bei einem gleichzeitigen Anstieg von Temperatur und Dehydratisierungsausmaß erfolgen. Die erste Dehydratisierung sollte bei Temperaturen erfolgen, die ausreichend gering sind, um die Dehydratisierung ohne einen Verlust der biologischen Aktivität zu ermöglichen. Die Konservierungsverfahren, die gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, werden in US-Patent Nr. 5.766.520 an Bronshtein und der gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldun-

gen Nr. 08/979.458 (jetzt ausgegeben als US-Patent Nr. 6.509.146) und 09/306.137 (jetzt ausgegeben als US-Patent Nr. 6.306.345), 09/589.381 (WO 01/94867) und 09/254.563 (US-Veröffentlichung Nr. US 2002-0051963 A1) offenbart, deren Offenbarungen hierin vollständig durch Verweis aufgenommen sind.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das Beibehalten der biologischen Aktivität oder Lebensfähigkeit während der Dehydratisierung von Viren oder Zellen maximiert werden, indem Trocknungsparameter basierend auf folgenden Kriterien ausgewählt werden: (1) der Schutz der dehydratisierten internen und externen Moleküle, Hüllen, Membranen und anderer biologischer Strukturen kann optimiert werden, indem die Viren oder Zellen mit schützenden Chemikalien beladen werden; (2) das Beladen kann durch das Äquilibrieren der Viren oder der Zellen in Beladungslösungen erfolgen, die durchdringende Schutzmittel enthalten; (3) die Glastemperatur der mit dem Schutzmittel beladenen Viren oder Zellen wird vorzugsweise über die gewünschte Lagerungs- und/oder Zufuhrtemperatur gesteigert; und (4) das Gemisch aus Viren oder Zellen und Schutzmittelformulierungen verbleibt während des Trocknens und der darauf folgenden Lagerung vorzugsweise zumindest teilweise in amorphem Zustand.

[0029] Schutzmittelformulierungen – Verschiedene Polyole und Polymere sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und können als Schutzmittel dienen, solange sie die Fähigkeit des biologisch aktiven Materials steigern, Trocknen und Lagerung standzuhalten, und die spezielle biologische Aktivität nicht beeinträchtigen. Während der Konservierung stellen Schutzmittelmoleküle neben der Stabilisierung von biologischen Materialien während der Dehydratisierung weitere Vorteile bereit (siehe unten als Hilfe zur Erzeugung von mechanisch stabilen Schäumen). Genauer gesagt können die Schutzmittel gemäß der vorliegenden Erfindung ohne Einschränkung Einfachzucker, wie z.B. Saccharose, Glucose, Maltose, Saccharose, Xylulose, Ribose, Mannose, Fructose, Raffinose und Trehalose, nicht-reduzierende Monosaccharid-Derivate und andere Kohlenwasserstoff-Derivate, Zuckeralkohole, wie z.B. Sorbit, synthetische Polymere, wie z.B. Polyethylenglykol, Hydroxyethylstärke, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und Polyethylenamin, sowie Zuckercopolymere, wie z.B. FICOLL und Dextran, und Kombinationen davon umfassen. Niedermolekulare hochlösliche Proteine können auch als Schutzmittel dienen.

[0030] In einer bevorzugten Variation der vorliegenden Erfindung, bei der Zellen, Viren, Virusteilchen und/oder virale oder nicht-virale Vektoren konserviert werden, kann die Schutzzusammensetzung weiters Gemische aus einem niedermolekularen Zucker, einem Disaccharid, einem Oligosaccharid und einem Polymer, beispielsweise einem biologischen Polymer, umfassen. Der niedermolekulare Zucker wird eingesetzt, um die intrazellulären Strukturen während der Dehydratisierung zu durchdringen und zu schützen. Die niedermolekularen durchdringenden Zucker können aus einer Vielzahl von Ketosen, die bei neutralem oder einem höheren pH nicht-reduzierend sind, oder methylierten oder ethylierten Monosacchariden ausgewählt werden. Zu den nichtreduzierenden Ketosen gehören: die Zucker mit 6 Kohlenstoffatomen, Fructose, Sorbose und Piscose; die Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen, Ribulose und Xylulose; der Zucker mit 4 Kohlenstoffatomen, Erythulose, und der Zucker mit 3 Kohlenstoffatomen, 1,3-Dihydroxydimethylketon. Zu den methylierten Monosacchariden gehören die methylierten α- und β-Formen von Gluco-, Manno- und Galactopyranosid. Zu den methylierten Verbindungen mit 5 Kohlenstoffatomen gehören die α- und β-Formen von Arabino- und Xylopyranosiden. Disaccharide, wie z.B. Saccharose, sind als wirksame Schutzmittel während des Wasserentzugs bekannt, da sie das Hydratisierungswasser auf der Oberfläche von biologischen Membranen und Makromolekülen ersetzen. Zusätzlich dazu können Saccharose und/oder andere Füllstoffe durch Trocknen unter Vakuum wirksam in stabile Schäume überführt werden, wobei die Schäume aus dünnen amorphen Filmen des konzentrierten Zuckers bestehen.

[0031] Die Kombination von Monosacchariden mit Disacchariden und Oligosacchariden verhindert wirksam die Kristallisierung der Oligosaccharide während der Dehydratisierung. Zusätzlich dazu kann ein Polymer eingesetzt werden, um die Glastemperatur (T_g) des dehydratisierten Gemischs zu erhöhen, die durch die Integration von niedermolekularen Monosacchariden gesenkt sein kann. Beliebige biologische Polymere, die in konzentrierten Zuckerlösungen löslich sind, können eingesetzt werden. Beispielsweise unterstützen Polysaccharide, wie z.B. FICOLL und Dextran, und synthetische Polymere, wie z.B. Hydroxyethylstärke, Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid, sowie hochlösliche natürliche und synthetische Biopolymere (z.B. Proteine) die Stabilisierung von biologischen Membranen und erhöhen die T_g.

[0032] Die Fähigkeit mancher Zucker, Zuckeralkohole und Aminosäuren, wie z.B. Mononatriumglutamat (MSG), biologische Materialien vor Beschädigung während des Trocknens und der darauf folgenden Lagerung zu schützen, ist bekannt. Es gibt verschiedene Publikationen, die die starke Schutzwirkung von Disacchariden, wie z.B. Saccharose oder Trehalose, für Biomakromoleküle und Membranen zeigen. Einige Forscher verwenden komplexere Gemische, die Monosaccharide (d.h. Glucose, Fructose etc.) oder niedermolekulare Zucke-

ralkohole (Mannit, Sorbit etc.) umfassen, um Zellen während des Gefriertrocknens zu schützen. Anders als Disaccharide dringen niedermolekulare Zucker und deren Derivate besser in das Innere der Zellen ein und stellen einen intrazellulären Schutz bereit. Aus diesem Grund wurden Monosaccharide und niedermolekulare Zuckeralkohole umfassend in Schutzmittelformulierungen eingesetzt, um Zellen und Viren vor Beschädigungen durch Dehydratisierung zu schützen.

[0033] Konservierungslösungen, die reduzierende Monosaccharide enthalten, beschädigen empfindliche Enzyme während der Lagerung nach dem Trocknen, und die Schädigungsrate steigt mit steigender Lagerungstemperatur schnell an (siehe Beispiel 1 unten). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass reduzierende Monosaccharide nur dann eingesetzt werden könnten, wenn die gefriergetrockneten Proben unterhalb einer Temperatur von 4 °C gelagert würden. Alternativ dazu kann die Schutzmittelformulierung, wenn die biologischen Proben bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen gelagert werden sollen, so ausgewählt werden, dass sie die Reduktionsleistung des Schutzmittels/der Schutzmittel minimiert. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind reduzierende Gruppen von Sacchariden methyliert, um einen verbesserten Schutz zu erzielen. Die reduzierenden Gruppen von Monosacchariden können gemäß der vorliegenden Erfindung auch chloriert, ethyliert etc. sein.

[0034] Niedermolekulare Kohlenwasserstoffadditive senken die Glastemperatur (T_g) von Zell- oder Virensuspensionen in der Schutzmittelformulierung. Die T_g von wasserfreier Fructose beträgt beispielsweise annähernd 7 °C; die T_g eines 1:1-Fructose:Saccharose-Gemischs in wasserfreiem Zustand ist etwas niedriger als 40 °C. Glucose weist eine deutlich höhere T_g auf. Aus diesem Grund kann der Einsatz von Glucosederivaten wirksamer sein. Die T_g von methylierter Glucose beträgt beispielsweise 29 °C (siehe **Fig. 4**).

[0035] Die weichmachende Wirkung von niedermolekularen Additiven in Konservierungslösungen kann insbesondere durch die Verwendung von löslichen höhermolekularen Additiven, die die T_g im wasserfreien Zustand erhöhen, wettgemacht werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Schutzmittelformulierung MSG, ein nicht-reduzierendes Oligosaccharid und ein lösliches Protein. Im Umfang dieser Patentanmeldung definieren die Erfinder die Temperaturen von zwischen etwa –20 °C und +50 °C als Raumtemperatur, um die meisten praktischen Anwendungen abzudecken. Vorzugsweise sind die Verfahren und Formulierungen, die in dieser Anmeldung offenbart werden, jedoch auf die Konservierung von Biomolekülen, Viren und Zellen zur Lagerung und/oder Zufuhr bei Raumtemperatur (20 °C-25 °C) oder höheren Temperaturen ausgerichtet.

[0036] Überraschenderweise waren Schutzmittelformulierungen, die methylierte Monosaccharide umfassten, besonders wirksam zum Schutz von Viren und Zellen. α-Methylglucose (Methyl-α-d-glucopyranosid) wies beispielsweise bei der Konservierung von empfindlichen biologischen Materialien durch Trocknen einzigartige Schutzeigenschaften auf. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass die Methylgruppe hydrophober ist als der Rest des Moleküls. Aus diesem Grund weist der methylierte Zucker ein amphiphiles Verhalten auf, wobei er vorzugsweise an hydrophobe Bereiche des Proteins, der Virushüllen oder anderer Membranstrukturen adsorbiert. Dieses Verhalten kann die Schutzwirkung von methylierter Glucose zum Teil erklären. Zusätzlich dazu besteht die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen, die mit Glucose beladen werden können, auch mit α-Methylglucose beladen werden können, um intrazellulären Schutz bereitzustellen. α-Methylglucose wurde umfassend eingesetzt, um den Glucosetransport durch die Zellmembran zu untersuchen. Methylierte Monosaccharide wurden nach dem Stand der Technik nicht zur Konservierung von biologischen Proben in trockenem Zustand eingesetzt.

[0037] Leider kristallisieren Lösungen von α-Methylglucose in Wasser während des Trocknens. Aus diesem Grund sollte α-Methylglucose gemeinsam mit anderen Füllstoffen (d.h. Saccharose, Trehalose, Maltrin, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Proteinen etc.) eingesetzt werden, um die Kristallisierung von α-Methylglucose zu minimieren und die Stabilität des amorphen Zustands während des Trocknens und der anschließenden Lagerung zu verbessern. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Saccharose/α-Methylglucose-Lösung während des Trocknens kristallisiert, hängt beispielsweise von dem Gewichtsverhältnis Saccharose/α-Methylglucose ab, wie unter Bezugnahme auf Beispiel 3 erläutert und gezeigt wird. Außerdem erhöht der Zusatz von höhermolekularen Additiven zu Schutzmittelformulierungen, die α-Methylglucose enthalten, die T_g, die in trockenem Zustand erzielt werden kann.

[0038] Erstes Schaumtrocknen – Um die Maßstabsvergrößerungen von Verarbeitungsverfahren zu erleichtern, umfasst die Konservierung durch Schaumbildung die Bildung einer mechanisch stabilen, porösen Struktur durch Sieden unter Vakuum. Der Trocknungsschritt erfolgt bei Temperaturen im Bereich von etwa –15 bis 70 °C. In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Probentemperatur während des ersten Trocknungs-

schritts etwa 5 °C oder weniger. Die Konservierung durch Schaumbildung ist besonders für das wirksame Trocknen von großen Probenvolumina vor der Verglasung und als Hilfe zur Herstellung eines bereits gemahlenen getrockneten Produkts geeignet, das sich für die kommerzielle Verwendung eignet. Ein Vorteil des Schaumtrocknens besteht darin, dass das Verfahren skalierbar ist, wodurch dieses zur Konservierung eines beliebigen Volumens einer Lösung oder Suspension herangezogen werden kann, die empfindliches bioaktives Material umfasst, beginnend bei Bruchteilen eines Milliliters (für Analyse- und Optimierungsverfahren) bis zu hunderten Litern (zur Produktion in industriellem Maßstab). Weitere Details zur Konservierung durch Schaumbildung sind in US-Patent Nr. 5.766.520 an Bronshtein zu finden.

[0039] Verdünnte biologische Proben können durch die teilweise Entfernung von Wasser vor dem Schaumtrocknen unter Vakuum eingeengt werden. Dieser anfängliche Einengungsschritt kann entweder vor oder nach dem Einführen der Probe in eine Verarbeitungskammer erfolgen, in Abhängigkeit von dem gewählten Einengungsverfahren. Alternativ dazu können manche Proben nach der Zugabe der schützenden Moleküle ausreichend eingeengt sein und deshalb keine anfängliche Einengung erfordern.

[0040] Wenn es wünschenswert ist, die Einengung der Proben zu steigern, umfassen Verfahren zum Einsatz für die anfängliche Einengung Gefriertrocknen, Verdampfen aus einem flüssigen oder teilweise gefrorenen Zustand, Umkehrosmose, weitere Membrantechnologien oder beliebige Konzentrationsverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind.

[0041] Die Proben werden Vakuum ausgesetzt, um sie während des Trocknens bei Temperaturen, die wesentlich niedriger sind als 100 °C, zum Sieden zu bringen. Wenn reduzierter Druck auf die Lösungen oder Suspensionen, die biologisch aktive Materialien enthalten, angewandt wird, schäumen die Lösungen oder Suspensionen während des Siedens, und während des Schäumprozesses verursacht eine weitere Entfernung von Lösungsmittel schließlich die Erzeugung eines mechanisch stabilen, porösen Schaums mit offenen oder geschlossenen Poren. Die mechanisch stabile, poröse Struktur, der Schaum, besteht aus dünnen amorphen Filmen der konzentrierten Füllstoffe.

[0042] Während geringer Vakuumdruck (im Bereich von 10.132,5-91.192,5 Pascal) angewandt werden kann, um das anfängliche Verdampfen zu erleichtern, um eine eingeengte, viskose Lösung zu produzieren, wird ein wesentlich höherer Vakuumdruck (0-3.199,7 Pascal) eingesetzt, um das Sieden hervorzurufen. Der Vakuumdruck für den Schritt des Siedens beträgt vorzugsweise 0-1.333,2 Pascal und noch bevorzugter weniger als etwa 533,3 Pascal. Sieden bedeutet in diesem Zusammenhang Keimbildung und das Entstehen von Blasen, die Wasserdampf, und nicht Luft oder andere Gase, enthalten. In manchen Lösungen kann es vorteilhaft sein, gelöste Gase durch die Anwendung eines geringen Vakuums (etwa 10.132,5-91.192,5 Pascal) auszuwaschen. Dieses "Entgasen" kann helfen, zu verhindern, dass die Lösung aus dem Trocknungsgefäß plötzlich austritt. Wenn die Lösung ausreichend eingeengt und viskos ist, kann ein starkes Vakuum eingesetzt werden, um gesteuertes Sieden oder Schäumen hervorzurufen. Die Konzentration der oben angeführten Schutzmittelmoleküle, in einem Bereich von 5-70 Gew.-%, während der anfänglichen Verdampfung unterstützt das Verhindern des Gefrierens unter dem folgenden starken Vakuum und verstärkt die Viskosität, wodurch das Schäumen erleichtert wird, während gleichzeitig ungesteuertes Ausbrechen eingeschränkt wird.

[0043] Starke Druck- oder Temperaturanstiege könnten ein Zusammenfallen des Schaums verursachen. Um die mechanische Stabilität der porösen Strukturen zu steigern, können Tenside zugesetzt werden, solange diese Additive die biologische Aktivität des gelösten Stoffes, der in die trockene Form umgesetzt werden soll, nicht beeinträchtigen. Außerdem trägt das Trocknen der Schutzmittelpolymere auch zu der mechanischen Stabilität der porösen Strukturen bei. Schäume, die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt werden, können vor den folgenden Verarbeitungsverfahren (z.B. Stabilitätstrocknen, Verglasung oder Zerkleinern) in der Verarbeitungskammer unter Vakuum, Trockengas, wie z.B. einer N_2-Atmosphäre, und/oder mit einem chemischen Sikkativ gelagert werden.

[0044] Stabilitätstrocknen/Verglasung – Die mechanisch stabilen Schäume, die während des ersten Trocknens gebildet wurden, können einem zweiten Trocknen oder einem "Stabilitätstrocknen" bei höheren Temperaturen unterzogen werden. Da die Glastemperatur (T_g) vom Wassergehalt der Probe abhängt und da T_g mit gesteigerter Dehydratisierung ansteigt, können in Abhängigkeit von der gewünschten Lagerungstemperatur verschiedene Trocknungsprotokolle angewandt werden, um eine T_g zu erzeugen, die der Verglasung (d.h. der Bildung eines festen amorphen Glases) beim Abkühlen auf diese Lagerungstemperatur entspricht. Da das Dehydratisieren von Materialien praktisch unmöglich ist, wenn sie einmal den Glaszustand erreicht haben, liegt der Schlüssel für die Verglasung gemäß der vorliegenden Erfindung, bei der Raumtemperatur als Lagerungstemperatur erwünscht ist, in der Durchführung des Stabilitätstrocknens bei einer Temperatur, die deutlich höher

ist als Raumtemperatur.

[0045] Die letztendlichen Lagerungstemperaturen liegen vorzugsweise im Bereich von 0-70 °C. Noch bevorzugter beträgt die gewählte Lagerungstemperatur 0, 4, 20, 40 und 50 °C oder mehr. Wenn gekühlte Lagerung bevorzugt wird, könnte das Stabilitätstrocknen bei Raumtemperatur erfolgen, gefolgt von dem Abkühlen auf die Lagerungstemperatur oder auf eine niedrigere Temperatur. Wenn jedoch Stabilität bei Raumtemperatur erwünscht ist, sollte die Dehydratisierung bei einer Temperatur über der Raumtemperatur erfolgen, gefolgt von dem Abkühlen auf Raumtemperatur.

[0046] Bei jeder zu konservierenden Probe bestimmen die Natur und die Stabilitätseigenschaften der Probe die Maximaltemperatur, der es während des ersten Trocknungsschritts standhalten kann. Bei Enzymkonservierung wurde gezeigt, dass die Stabilitätstrocknungstemperatur nach dem ersten Trocknen bei Raumtemperatur ohne einen Verlust der Enzymaktivität auf bis zu 50 °C gesteigert werden kann. Dann kann das Dehydratisierungsverfahren während des Stabilitätstrocknens bei einer höheren Temperatur fortgesetzt werden. Durch fortlaufende oder schrittweise Steigerungen der Dehydratisierungstemperatur können labile Proteine bei Temperaturen, die deutlich über ihrer Denaturierungstemperatur liegen, in einen Zustand thermischer Stabilität versetzt werden.

[0047] Zusätzlich zu der Durchführung des Stabilitätstrocknens bei einer Temperatur über der gewählten Lagerungstemperatur ist es wesentlich, dass dieses Trocknen über einen ausreichend langen Zeitraum hinweg erfolgt, um die T_g tatsächlich über die Lagerungstemperatur zu steigern. Basierend auf empirischen Ergebnissen, die mit getrockneten 10-µl-Tropfen aus 15-%-Saccharose-15-%-Raffinose-Lösung erhalten wurden, wurde gezeigt, dass mehr als 12 h langes Stabilitätstrocknen bei Temperaturen von mehr als 70 °C erforderlich waren, um die T_g über 25 °C zu erhöhen. Das erste Trocknen erfolgte in diesen Experimenten 12 h lang bei Raumtemperatur (20 °C). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ausgedehnte Dauer des Stabilitätstrocknens (mehr als 12 h bei 70 °C und mehr als 60 h bei 50 °C) erforderlich sein können, um einen Anstieg der T_g über Raumtemperatur zu erzielen. Bei manchen biologischen Materialien, die nicht wärmelabil sind, würde ein erstes Trocknen bei höheren Temperaturen die Dauer des Stabilitätstrocknens bei erhöhten Temperaturen senken, die erforderlich sind, um die T_g über die gewählte Lagerungstemperatur zu steigern.

[0048] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Schaum nach dem Stabilitätstrocknen auf die Zerkleinerungstemperatur abgekühlt, zerkleinert, und dann wird das Pulver einem weiteren Trocknen entweder unter Vakuum oder unter atmosphärischem Druck unterzogen. Die folgende Trocknungstemperatur kann im Bereich von etwa 0 °C bis 100 °C liegen. Dieses Trocknen kann fortgesetzt werden, bis die Glastemperatur über eine gewählte Lagerungstemperatur im Bereich von 0 bis 70 °C erhöht wurde.

[0049] Um sicherzustellen, dass die T_g tatsächlich über der Lagerungstemperatur liegt, sind zumindest zwei Verfahren bekannt, um die T_g mittels thermischer Analyse zu bestimmen. Die Differentialscanning-Kalorimetrie (DSC) ist das zumeist eingesetzte Verfahren. Der Erfinder hat jedoch festgestellt, dass DSC für die Bestimmung der T_g in Proben, die Polymere enthalten, unzuverlässig sein kann. Alternativ dazu sind Verfahren der thermisch stimulierten Polarisierung (TSP) besonders für die Analyse von Polymeren geeignet. Das TSP-Verfahren ist zu bevorzugen, da es für alle Proben zuverlässig ist, wenngleich es ein etwas größeres Probenvolumen erfordert.

[0050] Die folgenden Beispiele veranschaulichen spezifische Aspekte der vorliegenden Erfindung, die die Konservierung von Gemischen betrifft, die Viren oder Zellen und Schutzmittel umfassen, wobei die Gemische angepasst sind, um diese Proben während der Dehydratisierung und der folgenden Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen zu stabilisieren.

[0051] Beispiel 1: Vergleichsbeispiel – Die Wirkung von reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern und PVP auf Isocitratdehydrogenase (ICDH) wurde während der Lagerung bei Raumtemperatur und bei 37 °C untersucht. Dieses Experiment ist darauf ausgerichtet, die reduzierende Fähigkeit von Additiven, wie z.B. Zuckern, zu untersuchen. Diese reduzierende Eigenschaft ist durch die Fähigkeit gekennzeichnet, dass eine Maillard-Reaktion oder eine enzymatische Bräunungsreaktion hervorgerufen werden kann. Bei Monosacchariden oder Einfachzuckern neigt die Glykosyl-Hydroxylgruppe oder das OH an dem C dazu, chemisch mit den Aminoresten zu reagieren, die NH oder NH_2 enthalten, wie z.B. Lysin, Asparagin.

[0052] Das Enzym ICDH wurde in 50 % Glycerin formuliert. Die folgenden Konservierungslösungen wurden eingesetzt: (1) Lösung aus 30 % Saccharose und 10 % PVP, (2) Lösung aus 20 % Glucose und 20 % PVP, (3) Lösung aus 20 % Fructose und 20 % PVP und (4) Lösung aus 20 % Methyl-α-d-glucopyranosid und 10 % PVP.

[0053] ICDH (200 µl) wurde in kalter 0,1 M Tris-HCl 5 h lang bei 15-17 °C dialysiert. Der Puffer wurde sanft gerührt, um die kleinen Moleküle einheitlich in der Lösung zu dispergieren. Nach der Dialyse wurde die ICDH (Gesamtvolumen = 180 µl) in ein 1,7-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, zu dem 250 µl 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, zugesetzt wurden. Das Röhrchen wurde auf Eis gelagert.

[0054] Die ICDH (100-µl-Aliquoten) wurde nach der Zugabe einer der vier Konservierungslösungen in 1,7-ml-Mikrozenrifugenröhrchen konserviert. Die Konservierungsgemische wurden verwirbelt und dann in 40 Röhren mit jeweils 10 µl aliquotiert. Eine Probe von jedem der vier verschiedenen Konservierungsgemischen wurde zum Zeitpunkt Null getestet. Die verbleibenden Proben wurden bei Raumtemperatur unter Vakuum über Nacht getrocknet. Nach dem Trocknen wurde eine weitere Probe jedes Konservierungsgemischs getestet. Die verbleibenden Proben wurden in zwei Sätze aufgeteilt, einer für die Lagerung bei Raumtemperatur und einer für die Lagerung bei 37 °C. Alle zwei Wochen wurde eine Probe jedes Konservierungsgemischs und jeder Lagerungstemperatur in Bezug auf Aktivität getestet.

[0055] Alle zu testenden Proben wurden 10fach mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, verdünnt und durch Verwirbeln gemischt. Die verdünnten Proben (10 µl) wurden mit 3 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, 10 µl mM $MnSO_4$, 10 µl 50 mM Isocitrat und 10 µl 10 mM $NADP^+$-Lösung inkubiert. Die Absorption wurde im Verlauf der Zeit bei 340 nm gemessen. Die relative Aktivität wurde anhand der Veränderungen der Absorption bei 20 mV mit einer Streifengeschwindigkeit von 4 cm/min ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1A und Fig. 1B angeführt.

[0056] Beispiel 2: Vergleichsbeispiel – Die Wirkung von reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern und PVP auf Isocitratdehydrogenase (ICDH) wurde während der Lagerung bei 50 °C untersucht. Dieses Experiment ist darauf ausgerichtet, die reduzierende Fähigkeit von Additiven, wie z.B. Zuckern, zu untersuchen. Diese reduzierende Eigenschaft ist durch die Fähigkeit gekennzeichnet, dass eine Maillard-Reaktion oder eine enzymatische Bräunungsreaktion hervorgerufen werden kann. Bei Monosacchariden oder Einfachzuckern neigt die Glykosyl-Hydroxylgruppe oder das OH an dem C dazu, chemisch mit den Aminoresten zu reagieren, die NH oder NH_2 enthalten, wie z.B. Lysin, Asparagin.

[0057] Das Enzym ICDH wurde in 50 % Glycerin formuliert. Die folgenden Konservierungslösungen wurden eingesetzt: (1) Lösung aus 30 % Saccharose und 10 % PVP, (2) Lösung aus 20 % Glucose und 20 % PVP, (3) Lösung aus 20 % Fructose und 20 % PVP und (4) Lösung aus 20 % Methyl-α-d-glucopyranosid und 10 % PVP.

[0058] ICDH (200 µl) wurde in kalter 0,1 M Tris-HCl 5 h lang bei 15-17 °C dialysiert. Der Puffer wurde sanft gerührt, um die kleinen Moleküle einheitlich in der Lösung zu dispergieren. Nach der Dialyse wurde die ICDH (Gesamtvolumen = 180 µl) in ein 1,7-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, zu dem 250 µl 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, zugesetzt wurden. Das Röhrchen wurde auf Eis gelagert.

[0059] Die ICDH (100-µl-Aliquoten) wurde nach der Zugabe einer der vier Konservierungslösungen in 1,7-ml-Mikrozenrifugenröhrchen konserviert. Die Konservierungsgemische wurden verwirbelt und dann jeweils in 10 µl aliquotiert. Eine Probe von jedem der vier verschiedenen Konservierungsgemischen wurde zum Zeitpunkt Null getestet. Die verbleibenden Proben wurden bei Raumtemperatur unter Vakuum über Nacht getrocknet. Nach dem Trocknen wurde eine weitere Probe jedes Konservierungsgemischs getestet. Die verbleibenden Proben wurden bei 50 °C gelagert. Alle zwei Wochen wurde eine Probe jedes Konservierungsgemischs in Bezug auf Aktivität getestet.

[0060] Alle zu testenden Proben wurden 10fach mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, verdünnt und durch Verwirbeln gemischt. Die verdünnten Proben (10 µl) wurden mit 3 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, 10 µl mM $MnSO_4$, 10 µl 50 mM Isocitrat und 10 µl 10 mM $NADP^+$-Lösung inkubiert. Die Absorption wurde im Verlauf der Zeit bei 340 nm gemessen. Die relative Aktivität wurde anhand der Veränderungen der Absorption bei 20 mV mit einer Streifengeschwindigkeit von 4 cm/min ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 angeführt.

[0061] Beispiel 3 – Vergleichsbeispiel – Die Wirkung von reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern und Maltrin auf Isocitratdehydrogenase (ICDH) wurde während der Lagerung bei 50 °C untersucht. Dieses Experiment ist darauf ausgerichtet, die reduzierende Fähigkeit von Additiven, wie z.B. Zuckern, zu untersuchen. Diese reduzierende Eigenschaft ist durch die Fähigkeit gekennzeichnet, dass eine Maillard-Reaktion oder eine enzymatische Bräunungsreaktion hervorgerufen werden kann. Bei Monosacchariden oder Einfachzuckern neigt die Glykosyl-Hydroxylgruppe oder das OH an dem C dazu, chemisch mit den Aminoresten zu reagieren, die NH oder NH_2 enthalten, wie z.B. Lysin, Asparagin.

[0062] Das Enzym ICDH wurde in 50 % Glycerin formuliert. Die folgenden Konservierungslösungen wurden

eingesetzt: (1) Lösung aus 30 % Saccharose und 10 % Maltrin, (2) Lösung aus 20 % Glucose und 20 % Maltrin, (3) Lösung aus 20 % Fructose und 20 % Maltrin und (4) Lösung aus 20 % Methyl-α-d-glucopyranosid und 10 % Maltrin.

[0063] ICDH (200 µl) wurde in kalter 0,1 M Tris-HCl 5 h lang bei 15-17 °C dialysiert. Der Puffer wurde sanft gerührt, um die kleinen Moleküle einheitlich in der Lösung zu dispergieren. Nach der Dialyse wurde die ICDH (Gesamtvolumen = 180 µl) in ein 1,7-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, zu dem 250 µl 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, zugesetzt wurden. Das Röhrchen wurde auf Eis gelagert.

[0064] Die ICDH (100-µl-Aliquoten) wurde nach der Zugabe einer der vier Konservierungslösungen in 1,7-ml-Mikrozenrifugenröhrchen konserviert. Die Konservierungsgemische wurden verwirbelt und dann jeweils in 10 µl aliquotiert. Eine Probe von jedem der vier verschiedenen Konservierungsgemischen wurde zum Zeitpunkt Null getestet. Die verbleibenden Proben wurden bei Raumtemperatur unter Vakuum über Nacht getrocknet. Nach dem Trocknen wurde eine weitere Probe jedes Konservierungsgemischs getestet. Die verbleibenden Proben wurden bei 50 °C gelagert. Alle zwei Wochen wurde eine Probe jedes Konservierungsgemischs in Bezug auf Aktivität getestet.

[0065] Alle zu testenden Proben wurden 10fach mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, verdünnt und durch Verwirbeln gemischt. Die verdünnten Proben (10 µl) wurden mit 3 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, 10 µl mM $MnSO_4$, 10 µl 50 mM Isocitrat und 10 µl 10 mM $NADP^+$-Lösung inkubiert. Die Absorption wurde im Verlauf der Zeit bei 340 nm gemessen. Die relative Aktivität wurde anhand der Veränderungen der Absorption bei 20 mV mit einer Streifengeschwindigkeit von 4 cm/min ermittelt. Die Ergebnisse sind in **Fig. 2** angeführt.

[0066] Beispiel 4 – Vergleichsbeispiel – Um die Glastemperatur von Methyl-α-d-glucopyranosid zu messen, wurden Kristalle in einer Aluminiumpfanne für DSC-Untersuchungen eingeschlossen. Die Probe wurde zunächst während des Erhitzens geschmolzen und dann schnell auf –100 °C abgekühlt. Während des Abkühlens verglaste die Probe. Die Glastemperatur wurde während des Erwärmens (10 °C/min) gemessen. Die Veränderung der spezifischen Wärme in Zusammenhang mit dem Übergang von Glas in Flüssigkeit, T_g = 29 °C, ist in **Fig. 4** veranschaulicht.

[0067] Beispiel 5 – Vergleichsbeispiel – Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die Fähigkeit von Formulierungen zur Konservierung der Stabilität des amorphen (Glas-)Zustands während des Dehydratisierungsverfahrens und der anschließenden Lagerung bewerten zu können. Eine Beschädigung der Produkte kann während der Kristallisation oder aufgrund von Sprungbildung in der Glasmatrix auftreten. Die Kristallisation ist ein Prozess in zwei Schritten, der in übersättigten oder unterkühlten Lösungen auftritt. Der erste Schritt besteht in der Keimbildung mit der Bildung von stabilen Keimen der Phase, die kristallisieren wird. Die Bildung der Keime hängt experimentell von den Verunreinigungen im Material ab. Die Stabilisierung dieser Keime hängt von der Temperatur und der Konzentration von gelösten Stoffen oder gemeinsam gelösten Stoffen ab. Der zweite Schritt besteht in der Ausbreitung der Kristallisation durch Kristallbildungsprozesse ausgehend von der Keimgröße. Diese hängen auch von der Temperatur und der Konzentration verschiedener Komponenten in den Materialien ab. Die Keimbildung kann optimiert werden, wenn die Probe fast bis zum vollständig dehydratisierten Zustand getrocknet wird (wenn die Kristallisation der gelösten Stoffe rein ist), und die Kristallbildung wird begünstigt, wenn die Viskosität aufgrund der intrinsischen Wachstumskinetik gesenkt wird.

[0068] Lösungen wurden mit einem Masseanteil an gelösten Stoffen im Bereich von 30 bis 50 Gew.-% im Bereich der Löslichkeit der Verbindungen mit verschiedenen Gewichtsverhältnissen zwischen den Komponenten hergestellt, wie in den untenstehenden Tabellen angeführt. Alle Lösungen wurden durch 0,02-µm-Acrodisc™-Filtereinheiten filtriert.

[0069] Die Lösungen wurden in Tröpfchen auf Mikroskopplättchen aufgeteilt und dann, wie unten beschrieben, einem schnellen vollständigen Trocknen oder einem langsamen und unvollendeten Dehydratisierungsverfahren unterzogen. Die Tröpfchen (10 µl) wurden auf mit Alkohol gereinigte Mikroskopträger unter Einsatz einer 20-µl-Pipette zum Auftropfen von 10 µl Tröpfchen auf jeden Träger, 40 Tröpfchen pro Probe, aufgetropft. Es wurden Boxen mit einer DRIERITE™-(Sikkativ-)Schicht hergestellt. Die Probenträger wurden in den DRIERITE-Boxen angeordnet und unter Verwendung eines Parafilms abgeschlossen. Die Anzahl der gebildeten Kristalle wurde im Verlauf der Zeit bestimmt und aufgezeichnet. Nach zwei Wochen wurden die Proben in eine Atmosphäre (gesättigtes $Mg(NO_3)_2$) mit 52 % relativer Feuchtigkeit (RH) übertragen. Die Kristallanzahl wurde erneut im Verlauf der Zeit bestimmt und aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind untenstehend in den Tabellen 1-6 zusammengefasst.

TABELLE 1

50 % Saccharose-MSG-Tröpfchenkristallisierung

	Lagerung bei 0 % RH*		Lagerung bei 52 % RH**	
Verhältnis Saccharose:MSG	Woche 1	Woche 2	Woche 1	Woche 2
40:1	0,00	0,00	7,50	15,00
30:1	0,00	0,00	2,50	2,50
20:1	0,00	0,00	0,00	0,00
10:1	0,00	0,00	0,00	0,00
8:1	0,00	0,00	0,00	0,00
6:1	0,00	0,00	0,00	0,00
4:1	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5:1	0,00	0,00	0,00	0,00
1:40	7,50	N/A	12,50	15,00
1:30	60,00	N/A	77,50	77,50
1:20	72,50	N/A	75,00	75,00
1:10	72,50	N/A	75,00	75,00
1:8	75,00	N/A	80,00	80,00
1:06	95,00	N/A	95,00	95,00
1:04	42,50	N/A	42,50	42,50
1:2,5	5,00	N/A	5,00	5,00
1:01	0,00	N/A	0,00	0,00
50 % MSG	70,00	N/A	70,00	70,00

* DRIERITE™
** $Mg(NO_3)_2$

TABELLE 2

50 % Saccharose-MSG-Tröpfchenkristallisierung (nur DRIERITE™)

Verhältnis Saccharose:MSG	Woche 1	Woche 2
50 % Saccharose	0,00	0,00
40:1	0,00	0,00
30:1	0,00	0,00
20:1	0,00	0,00
10:1	0,00	0,00
8:1	0,00	0,00
6:1	0,00	0,00
4:1	0,00	0,00
2,5:1	0,00	0,00
1:1	0,00	0,00
1:2	0,00	0,00
1:4	2,50	2,50
1:6	0,00	0,00
1:8	15,00	15,00
1:10	65,00	65,00
1:20	92,50	92,50
1:30	97,50	97,50
1:40	2,50	2,50
50 % MSG	100,00	N/A

TABELLE 3

50 % Saccharose-Inosit-Tröpfchenkristallisierung

	Lagerung bei 0 % RH*		Lagerung bei 52 % RH**	
Verhältnis Inosit:MSG	Woche 1	Woche 2	Woche 1	Woche 2
4:1	90	100	N/A	N/A
6:1	100	N/A	N/A	N/A
8:1	0	100	N/A	N/A
10:1	0	70	100	N/A
12:1	0	67,5	100	N/A
16:1	0	0	100	N/A
20:1	0	0	100	N/A
50 % Saccharose	0	0	12,5	22,5

* DRIERITE™
** $Mg(NO_3)_2$

TABELLE 4

50 % Saccharose-Metyhl-α-d-glucopyranosid-(MAG-)Tröpfchenkristallisierung

	Lagerung bei 0 % RH*		Lagerung bei 52 % RH**	
Verhältnis Saccharose:MAG	Woche 1	Woche 2	Woche 1	Woche 2
50 % Saccharose	0,00	0,00	2,50	N/A
40:1	0,00	2,50	2,50	N/A
30:1	0,00	0,00	5,00	N/A
20:1	0,00	0,00	0,00	N/A
10:1	0,00	0,00	2,50	N/A
8:1	0,00	0,00	0,00	N/A
6:1	0,00	0,00	0,00	N/A
4:1	0,00	0,00	0,00	N/A
2:1	0,00	0,00	0,00	N/A
1:1	0,00	0,00	2,50	N/A
1:2	0,00	0,00	7,50	N/A
1:4	0,00	2,50	5,00	N/A
1:6	45,00	55,00	65,00	N/A
1:8	22,50	47,50	87,50	N/A
1:10	30,00	52,50	52,50	N/A
1:20	67,50	100,00	N/A	N/A
1:30	67,50	100,00	N/A	N/A
1:40	100,00	N/A	N/A	N/A
50 % MAG	100,00	N/A	N/A	N/A

* DRIERITE™
** $Mg(NO_3)_2$

TABELLE 5

50 % MSG-Metyhl-α-d-glucopyranosid-(MAG-)Tröpfchenkristallisierung

	Lagerung bei 0 % RH*		Lagerung bei 52 % RH**
Verhältnis MSG:MAG	Woche 1	Woche 2	Woche 1
50 % MSG	N/A	N/A	N/A
40:1	N/A	N/A	N/A
30:1	N/A	N/A	N/A
20:1	45,00	45,00	45,00
10:1	97,50	97,50	97,5
8:1	100,00	N/A	N/A
6:1	2,50	2,50	7,5
4:1	2,50	2,50	2,5
2:1	0,00	0,00	0
1:1	0,00	0,00	35
1:2	2,50	7,50	17,5
1:4	2,50	5,00	5
1:6	20,00	22,50	37,5
1:8	5,00	7,50	12,5
1:10	87,50	87,50	95
1:20	37,50	45,00	55
1:30	87,50	90,00	95
1:40	70,00	92,50	92,5
50 % MAG	100,00	N/A	N/A

* DRIERITE™
** $Mg(NO_3)_2$

[0070] Wenn 50 % MSG und Methyl-α-d-glucopyranosid eingesetzt wurden, wurde festgestellt, dass bei den Verhältnissen 40:1 und 30:1 die Lösungen jeweils kristallisierten, nachdem sie über Nacht bei Raumtemperatur gelagert worden waren (TABELLE 5).

[0071] Bezugnehmend auf die untenstehend angeführten Ergebnisse in TABELLE 6 kristallisierten die Lösungen bei 50 % der Verhältnisse 1:10, 1:20, 1:30 und 1:40 von MSG zu Trehalose über Nacht bei Raumtemperatur. In der Folge konnten für diese Formulierungen keine Tröpfchen analysiert werden.

TABELLE 6

50 % MSG-Trehalose-Tröpfchenkristallisierung (nur Dierite)

Verhältnis MSG:Trehalose	Woche 1
50 % MSG	100
40:1	100
30:1	0
20:1	2,5
10:1	0
8:1	5
6:1	0
4:1	0
2:1	0
1:1	0
1:2	0
1:4	100
1:6	0
1:8	100
1:10	N/A
1:20	N/A
1:30	N/A
1:40	N/A
50 % Trehalose	100

[0072] Beispiel 6 – Vergleichsbeispiel – Bovine Respiratorische Synzytial-Viren (BRSV), Rhinotracheitis-(IBR-)Viren, Virusdiarrhoe-(BVD-)Viren und Parainfluenza-3-(PI_3-)Viren wurden getrennt kultiviert und geerntet. Nach dem Ernten wurden die Viren mit Stabilisator gemischt und dann in etwa 40-ml-Aliquoten dispensiert und dann in einem Gefrierschrank bei –80 °C bis zur Verarbeitung gefroren.

[0073] Die folgenden 70-Gew.-%-Konservierungslösungen wurden in 0,01 M Phosphatpuffer hergestellt und durch Corning-0,22-μm-PES-(Polyesthersulfon-)Filtersysteme sterilfiltriert: (1) 2:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid, (2) 6:1 Saccharose:Inosit, (3) 2:1 Saccharose:Isomalt, (4) 5:2 Saccharose:Sorbit, (5) Trehalose und (6) 5:2 Saccharose:MSG.

[0074] Die Herstellung der Produkte erfolgte in einem Raum bei 18 °C. Die Viren wurden aus dem Gefrierschrank mit –80 °C entnommen und zum Auftauen (etwa 1 h) in kaltes Leitungswasser platziert. Unter Einsatz eines aseptischen Verfahrens wurde ein Gemisch der vier Viren in einem fixen Verhältnis in sterilen, konischen 50-ml-Polypropylenröhren hergestellt. Zwei Teile der sterilen Konservierungslösung wurden zu einem Teil des Virusgemischs zugesetzt. Ein homogenes Gemisch wurde durch Verwirbeln erhalten. Von jedem Viren-/Konservierungslösungs-Gemisch wurden 2,4 g in sterile 30-ml-Borsilicatglasserumphiolen (Wheaton) gefüllt. Ein steriler 13-mm-Lyophilisationsabschlussstopfen wurde bis zum ersten Anschlag in die Öffnung jeder Phiole platziert, wobei der Schlitz in dem Stopfen für die Wasserverdampfung während der Konservierung durch Schaumbildung offen gelassen wurde. Die Phiolen wurden dann auf einer Metalltrocknungsschale platziert. Die Trocknungsschalen wurden in einen vorgekühlten (5 °C) Gefriertrockner geladen, der so modifiziert worden war, um Konservierung durch Schaumbildung durchzuführen. Ein Thermoelement wurde in eine der Phiolen platziert, um die Probentemperatur während des Trocknungsverfahrens zu überwachen. Das Trocknungsverfahren wurde dann durchgeführt. Nach Beendigung der Konservierung durch Schaumbildung wurden die Phiolen unter Vakuum verschlossen und dann aus der Trocknungsvorrichtung entfernt. Die Phiolen wurden mit Aluminiumquetschdichtungen verschlossen und bei 4 °C gehalten. Die konservierten Proben sowie die gefrorenen Kontrollproben wurden durch folgende Verfahren getestet.

[0075] Madin-Darby-Bovine-Nieren-(MDBK-)Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 5 % Spenderpferdeserum (JRH Biologicals) aufbewahrt. Das Serum war ein Antikörper-Serum und frei von BVD, IBR, PI_3 und BRSV. Die folgenden Virus-neutralisierenden Seren wurden aus NVSL erhalten und für die Virus-Titration jeder Fraktion der Vakzine eingesetzt: BVDV-Antiserum NVSL Charge 4X; PI_3-Antiserum NVSL Charge 86.2; IBRV-Antiserum NVSL Charge 10X und BRSV-Antiserum NVSL Charge 88-5X.

[0076] Die Virustitration jeder Fraktion der BRSV-, IBR-, BVD- und PI_3-Proben wurde durch eine 4-Weg-Vakzine bestimmt, wobei die anderen drei Fraktionen mit Virus-spezifischem Antiserum neutralisiert wurden. Kulturen von MDBK-Zellen in einer 490-cm^2-Rollerflasche wurden mit Trypsin-EDTA (Charge Nr. 7B2028, JRH Bioscience) entfernt und in DMEM + 5 % Pferdeserum bei $1{,}5 \times 10^5$ Zellen pro ml suspendiert. Die 96-Well-Platten wurden mit 200 µl der Zellsuspension pro Well befüllt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag für die Virustitration eingesetzt, wobei die Zellen eine 80 % konfluente Monoschicht bildeten.

[0077] Jede Phiole konservierter Viren (4-Weg-Vakzine) wurde mit 15,5 ml DMEM rehydratisiert. Dies wurde als 10°-Verdünnung erachtet. Die vier Phiolen jeder rehydratisierten Vakzine wurden gepoolt und für die Virustitration eingesetzt. Als Kontrollviren dienten die gefrorenen Viren. Eine 0,1-ml-Probe der rehydratisierten Vakzine wurde entnommen und zu einer sterilen 1-ml-Phiole zugesetzt, die 0,3 ml jedes Antiserums für die anderen drei Viren enthielt. Wenn es um die Titration von BVD ging, wurden beispielsweise 0,1 ml der Vakzine zu einer Phiole zugesetzt, die 0,3 ml Anti-IBR-Serum, 0,3 ml Anti-BRSV-Serum und 0,3 ml Anti-PI_3-Serum enthielt. Das Gesamtvolumen betrug in dieser Phase 1,0 ml, und die Virusverdünnung entsprach 10^{-1}. Das Gemisch wurde 40 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

[0078] 10fache Verdünnungen der Viren wurden in 96-Well-Platten hergestellt, indem 22 µl der neutralisierten (10^{-1}-)Proben zu den Wells (200 µl) der ersten Reihe der Platte zugesetzt wurden. Jeder Well wurde gemischt (das entsprach einer Verdünnung von 10^{-2}), und 22 µl wurden in die zweite Reihe übertragen usw., bis die Platte voll war. Virus-Titrationen wurden in den Spalten 1-10 durchgeführt. Die Spalten 11 und 12 dienten als nicht infizierte Zellkontrollen. Die Platten wurden 4 Tage lang bei 37 °C in 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert. Die Infektion der Viren wurde durch die Bestimmung des zytopathischen Effekts (CPE) ermittelt. Schließlich wurden die Virustiter anhand des Reed-Muench-Verfahrens berechnet. Die Titer der vier Viren, die von den Kontrollviren und den konservierten Vakzinen erhalten wurden, wurden aufgezeichnet und mit dem Verlust der Viren während der Konservierung verglichen. Die Ergebnisse sind in TABELLE 7 angeführt; die beiden Zahlen stehen für die Ergebnisse der doppelten Experimente.

TABELLE 7

Schützende Wirkung von Methyl-α-d-glucopyranosid und Zuckeralkoholen für die Konservierung von BRSV-, IBR-, BVD- und PI_3-Viren

	Anfängliches Überleben (%) nach Konservierung			
Konservierungslösung	BRSV	IBR	BVD	PI_3
2:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid	57,5/64,6	52,5/37,2	66,1/58,9	125,9/89,1
6:1 Saccharose:Inosit	38,0/29,6	13,5/10,7	97,7/24,0	67,6/24,0
2:1 Saccharose:Isomalt	36,3/33,9	16,6/13,5	83,2/9,8	69,2/26,9
5:2 Saccharose:Sorbit	35,5	17,8	2,5	28,8
Trehalose	33,9	20,0	16,2	102,3
5:2 Saccharose:MSG	21,0/29,5	38,0/35,5	87,1/49,0	91,2/35,5

[0079] Beispiel 7: Vergleichsbeispiel – Newcastle- und Bronchitis-Viren wurden getrennt kultiviert und geerntet. Nach dem Ernten wurden die Viren mit Stabilisator gemischt und dann in etwa 200-ml-Aliquoten dispensiert und dann in einem Revco-Gefrierschrank bei –80 °C bis zur Verarbeitung gefroren.

[0080] Die folgenden 70-Gew.-%-Konservierungslösungen wurden in 0,01 M Phosphatpuffer hergestellt und durch Corning-0,22-µm-PES-(Polyesthersulfon-)Filtersysteme sterilfiltriert: (1) 2:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid, (2) 4:1 Saccharose:MSG, (3) 4:1 Saccharose:Maltit und (4) 13:1 Saccharose:Mannit.

[0081] Die Herstellung der Produkte erfolgte in einem Raum bei 18 °C. Die Viren wurden aus dem Gefrierschrank mit –80 °C entnommen und zum Auftauen (etwa 2 h) in kaltes Leitungswasser platziert. Unter Einsatz eines aseptischen Verfahrens wurde ein Gemisch der beiden Viren im Verhältnis 1:1 in sterilen, konischen 50-ml-Polypropylenröhren hergestellt. Zwei Teile der Konservierungslösung wurden zu einem Teil des Virusgemischs zugesetzt. Ein homogenes Gemisch wurde durch Verwirbeln erhalten. Von jedem Viren-/Konservierungslösungs-Gemisch wurden 3,0 g in sterile 30-ml-Borsilicatglasserumphiolen (Wheaton) gefüllt. Ein steriler 13-mm-Lyophilisationsabschlussstopfen wurde bis zum ersten Anschlag in die Öffnung jeder Phiole platziert, wobei der Schlitz in dem Stopfen für die Wasserverdampfung während der Konservierung durch Schaumbildung offen gelassen wurde. Die Phiolen wurden dann auf einer Metalltrocknungsschale platziert. Die Trocknungsschalen wurden in einen vorgekühlten (5 °C) Gefriertrockner geladen, der so modifiziert worden war, um die erfindungsgemäße Konservierung durch Schaumbildung durchzuführen. Ein Thermoelement wurde in eine der Phiolen platziert, um die Probentemperatur während des Trocknungsverfahrens zu überwachen. Nach der Konservierung wurden die Phiolen unter Vakuum verschlossen und dann aus der Trocknungsvorrichtung entfernt. Die Phiolen wurden mit Aluminiumquetschdichtungen verschlossen und bei Raumtemperatur oder 4 °C gehalten, abhängig von der T_d des Trocknungsdurchlaufs (d.h. Wenn T_d = 30 °C betrug, wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert; wenn T_d = 20 °C betrug, wurden die Proben unter Kühlung aufbewahrt).

[0082] Virustiter wurden wie obenstehend für Beispiel 6 beschrieben ermittelt. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind in TABELLE 8 angeführt.

TABELLE 8

Schützende Wirkung von Methyl-α-d-glucopyranosid und Zuckeralkoholen für die Konservierung von Newcastle- und Bronchitis-Viren

	Anfängliches Überleben (%) nach Konservierung	
Konservierungslösung	Newcastle	Bronchitis
2:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid	100	20,4
4:1 Saccharose:Maltit	56,2	2,4
13:1 Saccharose:Mannit	55,0	4,8
4:1 Saccharose:MSG	23,4	0,4

[0083] Beispiel 8: Vergleichsbeispiel – Zur Konservierung von Streptococcus equi wurde die folgende 70-Gew.-%-Konservierungslösung in 0,01 M Phosphatpuffer hergestellt und durch Corning-0,22-µm-PES-(Polyesthersulfon-)Filtersysteme sterilfiltriert. (1) 4:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid, (2) 1:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid und (3) 5:2 Saccharose:Glutamat.

[0084] Eine Phiole mit gefrorener Keimstammlösung (Charge WS012696) wurde aus dem Gefrierschrank mit –80 °C entfernt und in kaltem Wasser aufgetaut. Der gesamte Inhalt (1,0 ml) wurde in 150 ml "S.-equi-Kulturmedium" (Charge 0757) übertragen. Gemäß dem Mischungsgewicht wurden 20 g 50 % Dextrose zu dem Medium pro Liter zugesetzt. Der Kolben wurde mit gelöstem Verschluss bei 37 °C auf der Schüttelvorrichtung bei 100 U/min etwa 20 bis 24 h lang inkubiert. Die Kultur wurde wachsen gelassen, bis sie eine optische Dichte (OD) von 0,8-1,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm (12 h) erreichte. Ein Reinheitsabstrich wurde mit einer Schleifenmenge der Kultur auf TSA II + 5 % Blutagar (Charge K1RUWW) durchgeführt. Nach Inkubation für 24 bis 48 h bei 37 °C wurde die Platte untersucht, und es wurde keine Verunreinigung nachgewiesen.

[0085] Nach etwa 23,5 h Inkubation wurden 10 ml der Vorkultur in einen 500-ml-Kolben mit 250 ml Kulturmedium übertragen. Die Vorkultur wurde etwa 4 h lang unter den zuvor beschriebenen Bedingungen inkubiert. Ein weiterer Reinheitsstrich auf TSA II + 5 % Blutagar wurde durchgeführt. Die Absorption der Vorkultur betrug bei 600 nm 1,888.

[0086] Etwa 5 h später wurden 50 ml der zweiten Vorkultur in einen Fermenter, der 1000 ml S.-equi-Lösung + Dextrose enthielt, eingeimpft. Die Fermentationsbedingungen waren wie folgt: Belüftung mit Drucksauerstoff mit 1 l pro min, Schütteln mit 100 U/min und pH-Regulation unter Einsatz von 2,5 N HCl und 2,5 N NaOH bei einer Temperatur von 37 °C.

[0087] Wenn eine Kultur die stationäre Phase erreicht hatte, wurde die Zellkultur mit der Konservierungslö-

sung in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 gemischt. Ein homogenes Gemisch wurde durch Verwirbeln erhalten. Von jedem Virus-/Konservierungslösungs-Gemisch wurden 1,0 g in sterile 30-ml-Borsilicatglasserumphiolen (Wheaton) gefüllt. Ein steriler 13-mm-Lyophilisationsabschlussstopfen wurde bis zum ersten Anschlag in die Öffnung jeder Phiole platziert, wobei der Schlitz in dem Stopfen für die Wasserverdampfung während der Konservierung offen gelassen wurde. Die Phiolen wurden dann auf eine Metalltrocknungsschale platziert. Die Trocknungsschalen wurden in einen vorgekühlten (5 °C) Gefriertrockner geladen, der so modifiziert worden war, um das Schaumtrocknungsverfahren durchzuführen. Ein Thermoelement wurde in eine der Phiolen platziert, um die Probentemperatur während des Trocknungsverfahrens zu überwachen. Nach der Konservierung wurden die Phiolen unter Vakuum verschlossen und dann aus der Trocknungsvorrichtung entfernt. Die Phiolen wurden mit Aluminiumquetschdichtungen verschlossen und auf Raumtemperatur gehalten.

[0088] Aliquoten (1 g) jeder Kontrollprobe (Zellkultur + Konservierungslösung) wurden 10fach mit PBS verdünnt. Die Probenphiolen der konservierten Zellen wurden mit 10 ml PBS rehydratisiert. Die Kontrollproben und die konservierten Proben wurden weiter auf 10^{-4} und 10^{-5} verdünnt. Drei Ausbreitungsplatten mit 10^{-5} und 10^{-6} wurden auf Blutagar hergestellt. Die Platten wurden 48 h lang bei 37 °C inkubiert. Für alle Proben wurden die auf jeder Platte gebildeten Kolonien gezählt. Die Platten, die eine Ausbeute von zwischen 30 und 300 Kolonien lieferten, wurden zur Berechnung des CFU/ml herangezogen. Der CFU/ml für die konservierten Proben wurde dann durch den CFU/ml der Kontrollproben (Zellkultur) dividiert, um den Prozentsatz des Überlebens nach der Konservierung zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 angeführt.

[0089] Beispiel 9: Vergleichsbeispiel – Bovine Respiratorische Synzytial-Viren (BRSV), Rhinotracheitis-(IBR-)Viren, Virusdiarrhoe-(BVD-)Viren und Parainfluenza-3-(PI_3-)Viren wurden getrennt kultiviert und geerntet. Nach dem Ernten wurden die Viren mit Stabilisator gemischt und dann in etwa 40-ml-Aliquoten dispensiert und dann in einem Gefrierschrank bei –80 °C bis zur Verarbeitung gefroren.

[0090] Die folgenden 70-Gew.-%-Konservierungslösungen wurden in 0,01 M Phosphatpuffer hergestellt und durch Corning-0,22-µm-PES-(Polyesthersulfon-)Filtersysteme sterilfiltriert: (1) 2:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid, (2) 4:1 Saccharose:MSG und (3) 5:2 Saccharose:Raffinose.

[0091] Die Herstellung der Produkte erfolgte in einem Raum bei 18 °C. Die Viren wurden aus dem Gefrierschrank mit –80 °C entnommen und zum Auftauen (etwa 1 h) in kaltes Leitungswasser platziert. Unter Einsatz eines aseptischen Verfahrens wurde ein Gemisch der vier Viren in einem fixen Verhältnis in sterilen, konischen 50-ml-Polypropylenröhren hergestellt. Zwei Teile der sterilen Konservierungslösung wurden zu einem Teil des Virusgemischs zugesetzt. Ein homogenes Gemisch wurde durch Verwirbeln erhalten. Von jedem Viren-/Konservierungslösungs-Gemisch wurden 2,4 g in sterile 30-ml-Borsilicatglasserumphiolen (Wheaton) gefüllt. Ein steriler 13-mm-Lyophilisationsabschlussstopfen wurde bis zum ersten Anschlag in die Öffnung jeder Phiole platziert, wobei der Schlitz in dem Stopfen für die Wasserverdampfung während der Konservierung durch Schaumbildung offen gelassen wurde. Die Phiolen wurden dann auf einer Metalltrocknungsschale platziert. Die Trocknungsschalen wurden in einen vorgekühlten (5 °C) Gefriertrockner geladen, der so modifiziert worden war, um Konservierung durch Schaumbildung durchzuführen. Ein Thermoelement wurde in eine der Phiolen platziert, um die Probentemperatur während des Trocknungsverfahrens zu überwachen. Dann wurde das Trocknungsverfahren durchgeführt. Nach der Konservierung durch Schaumbildung wurden die Phiolen unter Vakuum verschlossen und dann aus der Trocknungsvorrichtung entfernt. Die Phiolen wurden mit Aluminiumquetschdichtungen verschlossen und bei 4 °C gehalten. Die konservierten Proben sowie die gefrorenen Kontrollproben wurden durch folgende Verfahren getestet.

[0092] Madin-Darby-Bovine-Nieren-(MDBK-)Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 5 % Spenderpferdeserum (JRH Biologicals) aufbewahrt. Das Serum war ein Antikörper-Serum und frei von BVD, IBR, PI_3 und BRSV. Die folgenden Virus-neutralisierenden Seren wurden aus NVSL erhalten und für die Virus-Titration jeder Fraktion der Vakzine eingesetzt: BVDV-Antiserum NVSL Charge 4X; PI_3-Antiserum NVSL Charge 86.2; IBRV-Antiserum NVSL Charge 10X und BRSV-Antiserum NVSL Charge 88-5X.

[0093] Die Virustitration jeder Fraktion der BRSV-, IBR-, BVD- und PI_3-Proben wurde durch eine 4-Weg-Vakzine bestimmt, wobei die anderen drei Fraktionen mit Virus-spezifischem Antiserum neutralisiert wurden. Kulturen von MDBK-Zellen in einer 490-cm^2-Rollerflasche wurden mit Trypsin-EDTA (Charge Nr. 7B2028, JRH Bioscience) entfernt und in DMEM + 5 % Pferdeserum bei $1,5 \times 10^5$ Zellen pro ml suspendiert. Die 96-Well-Platten wurden mit 200 µl der Zellsuspension pro Well befüllt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag für die Virustitration eingesetzt, wobei die Zellen eine 80 % konfluente Monoschicht bildeten.

[0094] Jede Phiole konservierter Viren (4-Weg-Vakzine) wurde mit 15,5 ml DMEM rehydratisiert. Dies wurde

als 10°-Verdünnung erachtet. Die vier Phiolen jeder rehydratisierten Vakzine wurden gepoolt und für die Virustitration eingesetzt. Als Kontrollviren dienten die gefrorenen Viren. Eine 0,1-ml-Probe der rehydratisierten Vakzine wurde entnommen und zu einer sterilen 1-ml-Phiole zugesetzt, die 0,3 ml jedes Antiserums für die anderen drei Viren enthielt. Wenn es um die Titration von BVD ging, wurden beispielsweise 0,1 ml der Vakzine zu einer Phiole zugesetzt, die 0,3 ml Anti-IBR-Serum, 0,3 ml Anti-BRSV-Serum und 0,3 ml Anti-PI_3-Serum enthielt. Das Gesamtvolumen betrug in dieser Phase 1,0 ml, und die Virusverdünnung entsprach 10^{-1}. Das Gemisch wurde 40 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

[0095] 10fache Verdünnungen der Viren wurden in 96-Well-Platten hergestellt, indem 22 µl der neutralisierten (10^{-1}-)Proben zu den Wells (200 µl) der ersten Reihe der Platte zugesetzt wurden. Jeder Well wurde gemischt (das entsprach einer Verdünnung von 10^{-2}), und 22 µl wurden in die zweite Reihe übertragen usw., bis die Platte voll war. Virus-Titrationen wurden in den Spalten 1-10 durchgeführt. Die Spalten 11 und 12 dienten als nicht infizierte Zellkontrollen. Die Platten wurden 4 Tage lang bei 37 °C in 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert. Die Infektion der Viren wurde durch die Bestimmung des zytopathischen Effekts (CPE) ermittelt. Schließlich wurden die Virustiter anhand des Reed-Muench-Verfahrens berechnet. Die Titer der vier Viren, die von den Kontrollviren und den konservierten Vakzinen erhalten wurden, wurden aufgezeichnet und mit dem Verlust der Viren während der Konservierung verglichen. Die Ergebnisse sind in TABELLE 9 angeführt.

TABELLE 9

	Überleben (%) nach Konservierung			
Konservierungslösung	BRSV	IBR	BVD	PI_3
2:1 Saccharose:MAG	115,0	12,6	97,7	105,0
4:1 Saccharose:MAG	63,1	7,4	37,2	85,1
5:2 Saccharose:Raffinose	44,7	4,6	77,6	34,7

[0096] Beispiel 10: Vergleichsbeispiel – Eine Formulierung aus in Perfluordecalin suspendierter, konservierter Luciferase (Sigma Nr. L-9580) wurde hergestellt und in Bezug auf Stabilität getestet. Gefriergetrocknete Luciferase (1 mg) wurde mit 1 ml 0,1 M Trispuffer, pH 7,4, der 1 mg/ml BSA enthielt, gelöst. Die resultierende 1-mg/ml-Luciferaselösung wurde in 500 ml 0,1 M Trispuffer, pH 7,4, der 1 mg/ml BSA enthielt, bei 4 °C 3,5 h lang dialysiert. Die dialysierte Luciferase wurde dann in ein Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, und die Luciferasekonzentration wurde anhand der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\text{Luciferasekonzentration} = \frac{\mu\text{g anfänglicher Luciferase}}{\text{Endvolumen der dialysierten Luciferase (ml)}}$$

[0097] Ein Konservierungsgemisch wurde durch das Mischen von 500 µl dialysierter 1-µg/µl-Luciferase mit 99,5 g einer 50%igen 10:1-Saccharose:MSG-Konservierungslösung hergestellt. Das Konservierungsgemisch wurde dann in neun sterile 100-ml-Serumphiolen gewogen, 10 ± 0,05 g pro Phiole. Die verbleibende dialysierte Luciferase wurde in 20 Mikrozentrifugenröhren, jeweils 20 µg, aliquotiert und bei –80 °C gelagert, um weiter als Standard-Luciferase eingesetzt zu werden. Die Konservierungsgemisch-Proben wurden 4,5 h lang auf 20 °C getrocknet, dann 60 h lang auf 45 °C, dann 8 h lang auf 60 °C, dann 16,5 h lang auf 65 °C. Die Proben wurden dann unter Vakuum verschlossen. Die Phiolen wurden in einen trockenen Raum (relative Feuchtigkeit ˜14 %) untergebracht. Die Phiolen wurden geöffnet, und die Schäume wurden in einen sterilen Zerkleinerungskolben herausgekratzt. Die Schäume wurden sanft zerkleinert. Das resultierende Pulver wurde in sterile Phiolen, 1,07 bis 1,11 g/Phiole, eingewogen. 2 ml Perfluordecalin (Aldrich Nr. p-990-0) wurde dann zu jeder Phiole zugesetzt, und die Phiolen wurden mit der trockenen Luft verschlossen und in einen 37-°C-Inkubator gefüllt.

[0098] Luciferase-Testreagens und PBS, die 1 mg/ml BSA enthielt, wurden bei Raumtemperatur (RT) zumindest 30 min lang äquilibriert. 9,42 ml PBS, die 1 mg/ml BSA enthielt, wurden zu einer zerkleinerten Probe (1 µg/ml) zugesetzt und gemischt. 1 µg/ml dieser Lösung wurde eingesetzt, um Reihenverdünnungen mit dem Faktor 10 durchzuführen, um eine Endkonzentration von 1×10^{-5} µg/ml zu erhalten. Ein Reaktionsgemisch wurde durch das Mischen von 100 µl RT-Luciferase-Testreagens mit 20 µl der verdünnten Luciferase hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde dann in ein Luminometer platziert, und das erzeugte Licht wurde 1 min lang alle 10 s gemessen. Die relative Lichteinheit pro Sekunde (RLU/s) wurde über der relativen Enzymkonzentration (µg/ml) geplottet.

[0099] Jedes Mal, wenn eine zerkleinerte Luciferase-Probe in Perfluordecalin getestet wurde, wurde eine Standard-Luciferase-Probe zur Kontrolle getestet. Der Standard-Luciferase-Test wurde durchgeführt, indem zunächst 1 Phiole Luciferase-Test-Substrat mit 10 ml Luciferase-Testpuffer gelöst wurde und dann zumindest 30 min lang bei RT äquilibriert. Dann wurden Reihenverdünnungen der Standard-Luciferase mit dem Faktor 10 ausgehend von der ursprünglichen Konzentration durchgeführt, um eine Konzentration im Bereich von 1×10^{-5} µg/ml bis 1 µg/ml zu erhalten. Das Reaktionsgemisch wurde durch das Mischen von 100 µl RT-Luciferase-Testreagens mit 20 µl verdünnter Luciferase erhalten. Das Reaktionsgemisch wurde in das Luminometer platziert, und das erzeugte Licht wurde 1 min lang alle 10 s gemessen. Die relative Lichteinheit pro Sekunde (RLU/s) wurde über der relativen Enzymkonzentration (µg/ml) geplottet. Die Aktivität der zerkleinerten Luciferase in Perfluordecalin wurde dann mit der Standard-Luciferase-Aktivität verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 angeführt.

[0100] Beispiel 11: Vergleichsbeispiel – Der Bakterienstamm Lactobacillus acidophilus wurde in einem Fermenter mit einer Kapazität von 2 l unter Verwendung eines für die Spezies spezifischen Standardprotokolls kultiviert. Die Fermenter-Zellpopulation wurde mit $8{,}1 \forall 0{,}73 \times 10^{8}$ gezählt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet, wodurch man ein Zellkonzentrat in 200 ml mit einer Population von $7{,}83 \forall 0{,}75 \times 10^{9}$ erhielt. Das Zellkonzentrat wurde in einer Konservierungslösung verdünnt, die aus 800 ml 40 % Saccharose, 10 % Methyl-α-d-glucopyranosid gelöst in 50 % Puffer bestand (Gew.-%). Das resultierende Gemisch wurde in einen Polyethylen-Petrischalen-Beutel mit 300 ml gefüllt. Der Rest wurde für eine andere Verwendung aufbewahrt. Der leere Polyethylen-Beutel wurde an einer Haltevorrichtung in einer zylinderförmigen Glaskammer mit 4,5 × 19 Zoll befestigt, gestützt von einem Aluminiumrahmen. Diese Glaskammer diente als Massentrocknungskammer zur Konservierung durch Schaumbildung. Die Testlösung wurde mit Hilfe einer Länge Siliconröhrchen in den Polyethylenbeutel gefüllt. Die Glaskammer wurde auch mit einem externen Glaswassermantel entlang der gesamten Länge des Röhrchens ausgestattet. Der Mantel wurde an ein zirkulierendes Wasserbad mit gesteuerter Temperatur gekoppelt. Der Wassermantel diente als Wärmequelle für das Verfahren. Die Glaskammer wurde an dem Auslassende mit dem Kondensator eines Gefriertrockners verbunden. Bei Abschluss der Konservierung durch Schaumbildung wurde das Systemvakuum mit trockenem Stickstoff gebrochen. Der Beutel wurde entfernt und untersucht. Trockener, mechanisch stabiler, brüchiger Schaum war hergestellt worden. Das Material wurde mit leichtem Druck der Hände sanft in Teilchen mit der Konsistenz von Sand zerkleinert. Der Beutel wurde aufgeschnitten, und der Inhalt wurde in ein sauberes Gefäß übertragen. Aus dem Gefäß wurden drei Proben entnommen. Das Gefäß wurde dann mit trockenem Stickstoff gespült und abgeschlossen. Die Proben wurden kultiviert, und die Zellpopulationen wurden mit den Kontrollkulturen von 1 ml getrocknetem Lactobacillus acidophilus verglichen, die in 10-ml-Phiolen durch dasselbe Verfahren schaumgetrocknet worden waren. Die Ergebnisse, die das Überleben des Testbakterienstamms zeigen, sind in TABELLE 10 zusammengefasst.

TABELLE 10

Probenursprung	Plattenkeimzahlmittel	Plattenkeimzahlstandardabweichung	Getestete Masse (g)	Volumen Verdünnungsmittel (ml)	Aktivität Zelle/g	Mittel pro Probe	% lebensfähig über Phiolenkontrolle
Beutel A	1,21E+09	0,91E+07	0,2415	2,4	1,21E+09	1,12E+09	92,50
Beutel A	1,09E+09	1,05E+08	0,3366	3,4	1,09E+09		83,10
Beutel A	1,07E+09	1,07E+08	0,1848	1,8	1,07E+09		81,32

[0101] Modifikationen der oben beschriebenen Arten der Ausführung der verschiedenen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung, die den hierin dargelegten Lehren der vorliegenden Erfindung folgen, klar. Die oben beschriebenen Beispiele dienen nicht der Einschränkung, sondern lediglich als Beispiele für die vorliegende Erfindung, deren Umfang durch die folgenden Ansprüche definiert wird.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, die für die Konservierung durch Schaumbildung geeignet ist, wobei sie Folgendes umfasst:

– eine Lebendvakzine, umfassend Viren, Bakterien oder Parasiten, wobei die Vakzine auf den Verlust der Lebensfähigkeit während des Trocknens oder der Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen empfindlich reagiert;
– ein methyliertes Monosaccharid, das aus α-Methylglucose besteht; sowie
– einen Füllstoff, um die α-Methylglucose-Kristallisation zu minimieren und um die Stabilität des amorphen Zustands während des Trocknens und der Lagerung zu erhöhen, wobei der Füllstoff aus der aus Saccharose, Trehalose, Polyvinylpyrrolidon und Proteinen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin das Konservierungsgemisch eine Gesamtmasse gelöster Stoffe aufweist und worin das methylierte Monosaccharid zwischen 5 und 80 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, worin das methylierte Monosaccharid zwischen 20 und 60 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

4. Zusammensetzung nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3, worin das Konservierungsgemisch eine Gesamtmasse gelöster Stoffe aufweist und worin es sich beim Füllstoff um Saccharose oder Trehalose handelt, wobei der Füllstoff zwischen 5 und 80 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, worin der Füllstoff zwischen 20 und 60 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

6. Zusammensetzung nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5, worin es sich beim Füllstoff um Saccharose handelt und worin das Verhältnis von Saccharose zu α-Methylglucose von 4:1 bis 1:2 liegt.

7. Verfahren zum Konservieren einer Lebendvakzine, umfassend ein Virus, ein Bakterium oder einen Parasiten, wobei die Vakzine auf den Verlust der Lebensfähigkeit während des Trocknens oder der Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen empfindlich reagiert, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
das Mischen der Lebendvakzine, umfassend ein Virus, ein Bakterium oder einen Parasiten, mit einem Schutzmittel, das ein methyliertes Monosaccharid, bestehend aus α-Methylglucose, umfasst, und zumindest einem zusätzlichen Füllstoff, um die α-Methylglucose-Kristallisation zu minimieren und um die Stabilität des amorphen Zustands während des Trocknens und der Lagerung zu erhöhen, wobei der Füllstoff aus der aus Saccharose, Trehalose, Polyvinylpyrrolidon und Proteinen bestehenden Gruppe ausgewählt ist, um ein Konservierungsgemisch zu bilden; sowie
das Trocknen des Konservierungsgemisches, worin zumindest ein Teil der Lebensfähigkeit der Lebendvakzine, umfassend Viren, Bakterien oder Parasiten, während des Trocknungsprozesses und während der darauf folgenden Lagerung bei Raumtemperatur oder höheren Lagerungstemperaturen beibehalten wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin das Trocknen durch Gefriertrocknung, Wasserentzug, Sprühtrocknung, Fließbett-Trocknung, Trocknung in einem Vakuum, Trocknung in einer trockenen Atmosphäre und Trocknung durch Schaumbildung erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, worin das Konservierungsgemisch eine Gesamtmasse gelöster Stoffe aufweist und worin das methylierte Monosaccharid zwischen 5 und 80 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin das methylierte Monosaccharid zwischen 20 und 60 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

11. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 7 bis 10, worin es sich bei dem zumindest einen zusätzlichen Füllstoff um Saccharose oder Trehalose handelt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin das Konservierungsgemisch eine Gesamtmasse gelöster Stoffe aufweist und worin der zumindest eine zusätzliche Füllstoff zwischen 5 und 80 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin der Füllstoff zwischen 20 und 60 Gewichtsprozent der Gesamtmasse der gelösten Stoffe umfasst.

14. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 7 bis 13, worin es sich bei dem zumindest einen zusätzlichen Füllstoff um Saccharose handelt und worin das Verhältnis von Saccharose zu α-Methylglucose zwischen 4:1 und 1:2 liegt.

15. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 7 bis 14, worin der Mischungsschritt weiters zumindest zwei Schritte umfasst, umfassend das Beladen der Lebendvakzine, die Viren, Bakterien oder andere Parasiten umfasst, mit dem methylierten Monosaccharid und das anschließende Hinzufügen des zumindest einen zusätzlichen Füllstoffs, um das Konservierungsgemisch zu bilden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin das Beladen durch Äquilibrierung der Lebendvakzine, umfassend Viren, Bakterien oder andere Parasiten, in einer Lösung erreicht wird, die das methylierte Monosaccharid enthält.

17. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 7 bis 16, worin der Trocknungsschritt das Sieden unter Vakuum umfasst, um einen stabilen Schaum zu bilden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, weiters umfassend den Schritt des Mahlens des stabilen Schaums, um ein Pulver zu erhalten.

19. Verfahren nach Anspruch 18, weiters umfassend den Schritt der Sekundärtrocknung des Pulvers.

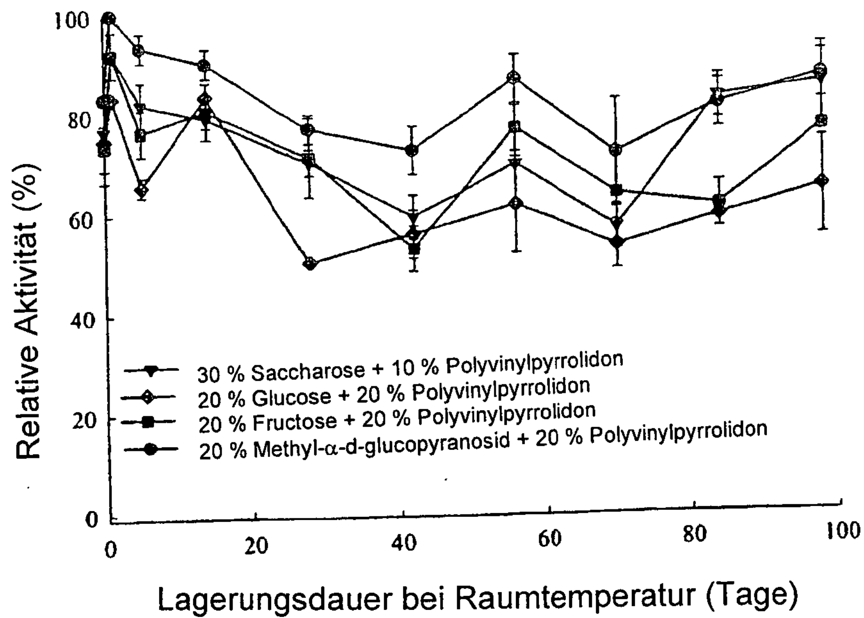
20. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 7 bis 17, weiters umfassend einen Schritt der Sekundärtrocknung.

21. Verfahren nach Anspruch 20, worin die Sekundärtrocknung bei einer Temperatur in einem Bereich von 0 °C bis 100 °C durchgeführt wird.

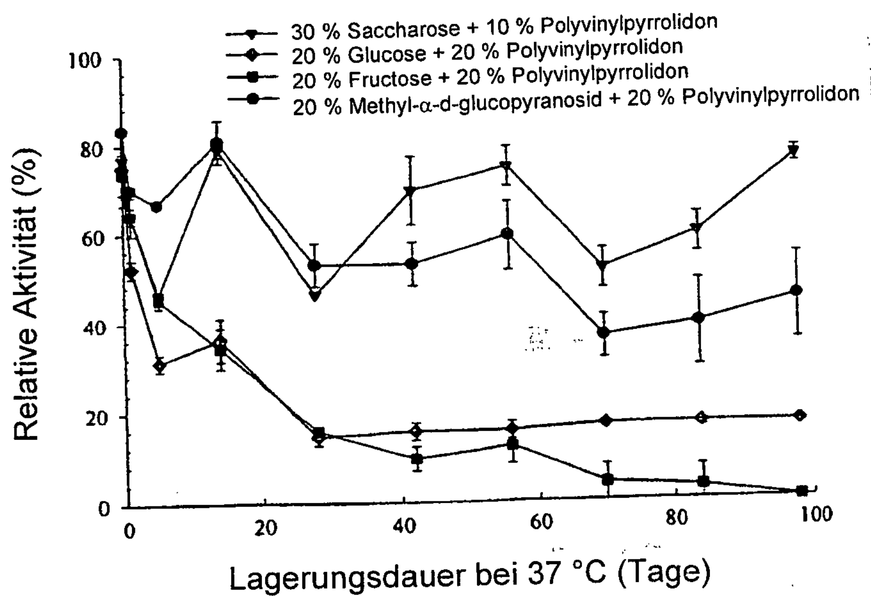
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, worin die Sekundärtrocknung fortgeführt wird, bis die Glastemperatur über eine ausgewählte Lagerungstemperatur innerhalb eines Bereichs von 0 °C bis 70 °C erhöht wurde.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

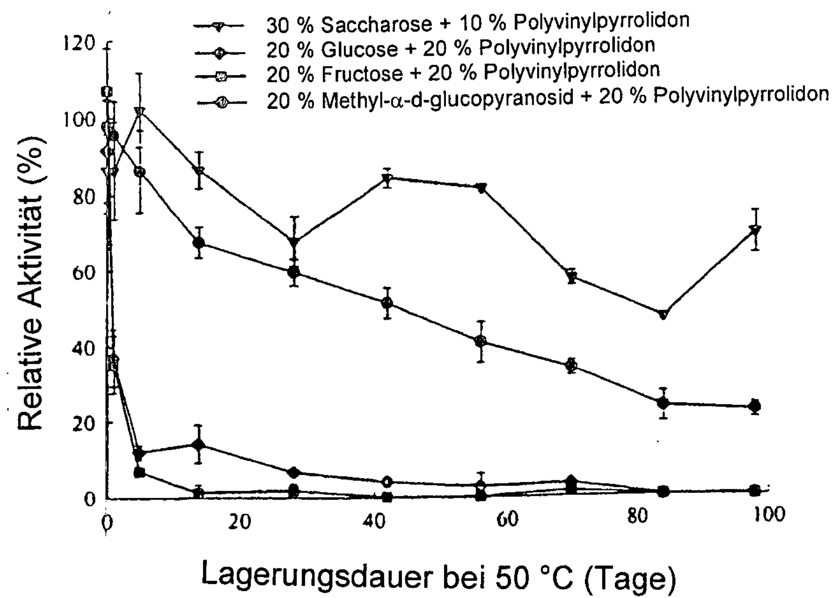


Figur 1A

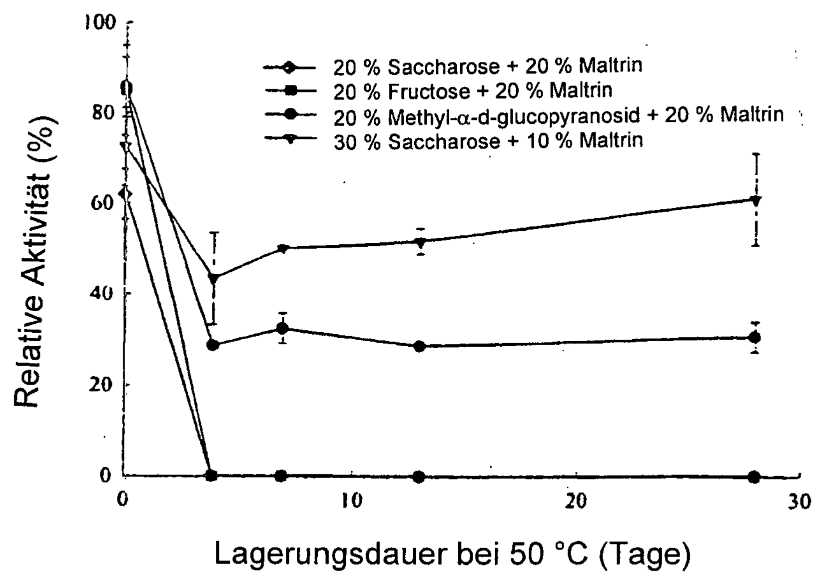


Figur 1B

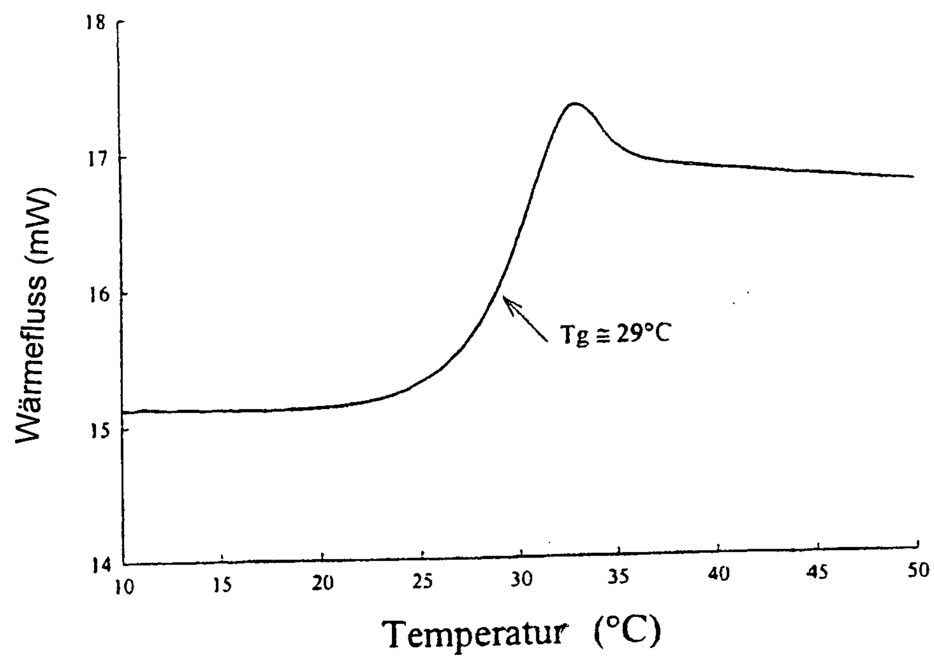
Figur 2



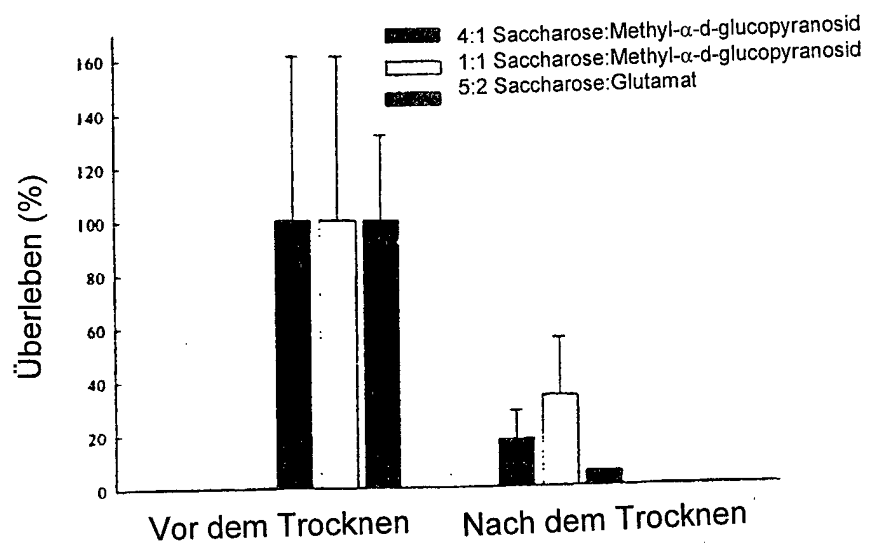
Figur 3



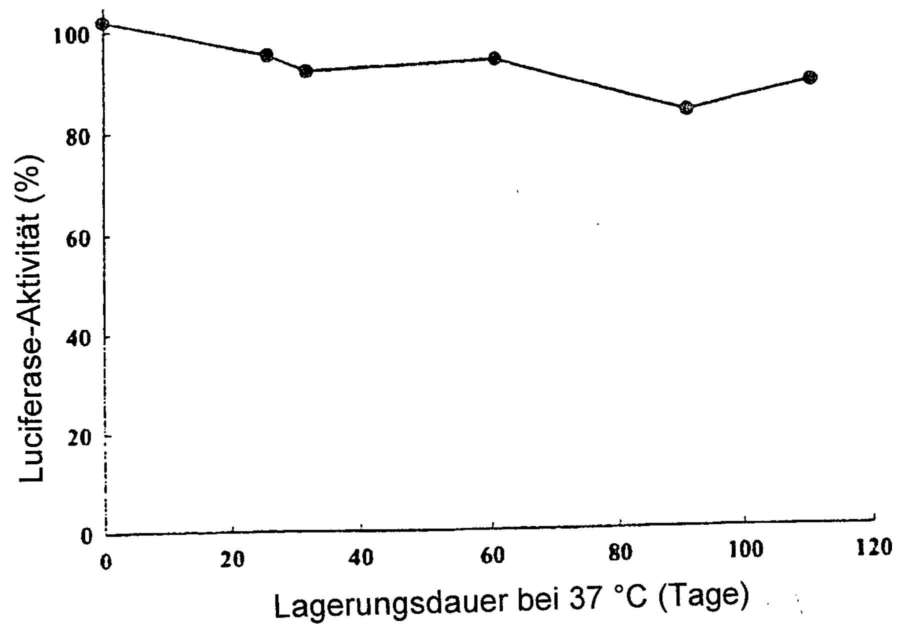
Figur 4


18
17
16
15
14
Wärmefluss (mW)
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Temperatur (°C)
Tg ≅ 29°C

Figur 5


4:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid
1:1 Saccharose:Methyl-α-d-glucopyranosid
5:2 Saccharose:Glutamat
Überleben (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Vor dem Trocknen
Nach dem Trocknen

Figur 6


100
80
60
40
20
0
Luciferase-Aktivität (%)
0
20
40
60
80
100
120
Lagerungsdauer bei 37 °C (Tage)